

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

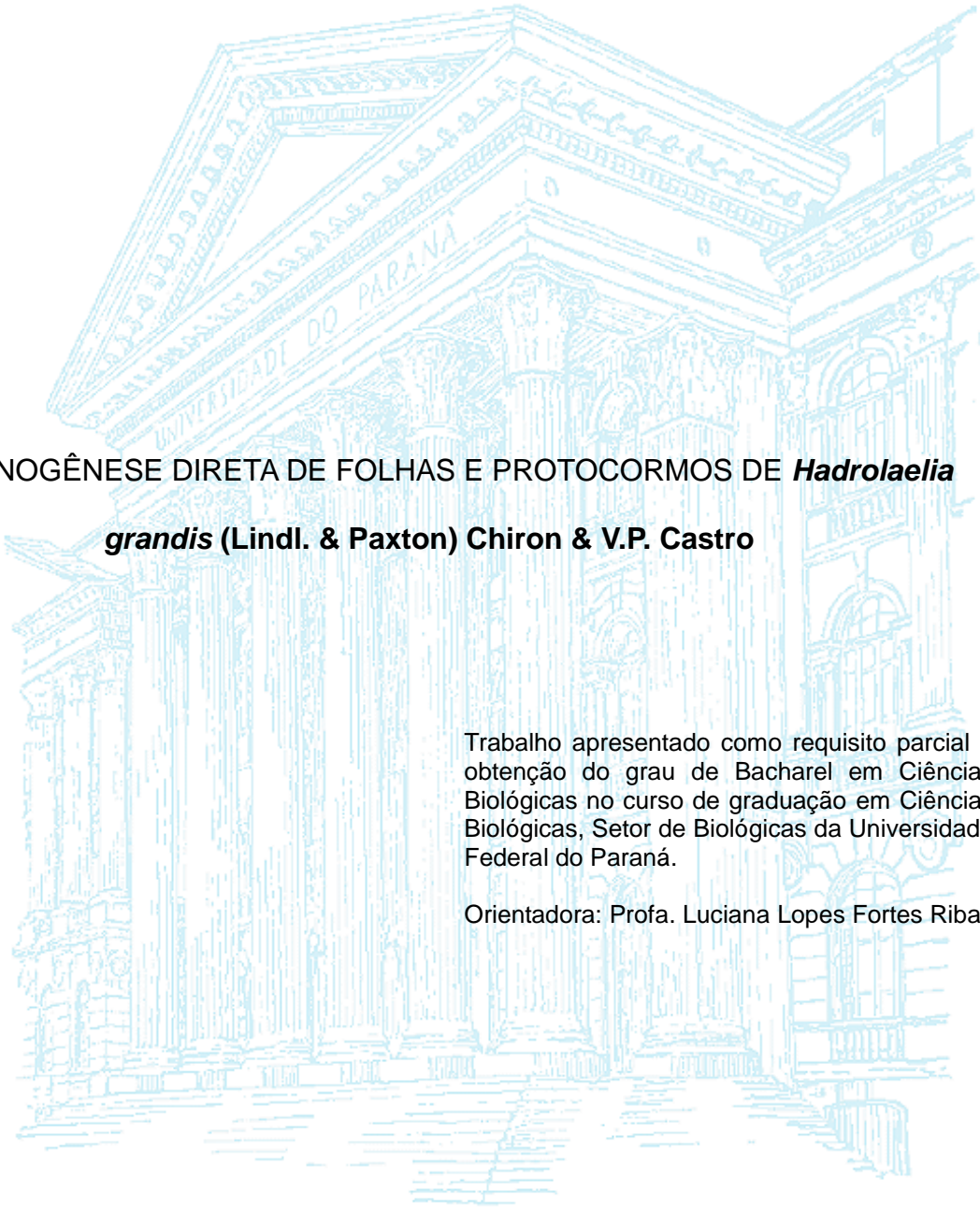
THAIS GUEDES GUIDA

ORGANOGENESE DIRETA DE FOLHAS E PROTOCORMOS DE *Hadrolaelia*
grandis (Lindl. & Paxton) Chiron & V.P. Castro

CURITIBA
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THAIS GUEDES GUIDA



ORGANOGENESE DIRETA DE FOLHAS E PROTOCORMOS DE *Hadrolaelia grandis* (Lindl. & Paxton) Chiron & V.P. Castro

Trabalho apresentado como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas no curso de graduação em Ciências Biológicas, Setor de Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Luciana Lopes Fortes Ribas

CURITIBA
2015

TERMO DE APROVAÇÃO

THAIS GUEDES GUIDA

ORGANOGENESE DIRETA DE FOLHAS E PROTOCORMOS DE *Hadrolaelia grandis* (Lindl. & Paxton) Chiron & V.P. Castro

Trabalho apresentado como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas no curso de graduação em Ciências Biológicas, pela seguinte banca examinadora:

Profa: Luciana Lopes Fortes Ribas
Orientadora – Setor de Ciências Biológicas, UFPR.

Profa: Giovana Bomfim de Alcântara
Setor de Engenharia Florestal, UFPR

Profa: Marguerite Quoirin
Setor de Ciências Biológicas, UFPR.

Aos meus pais e namorado, que foram os principais incentivadores do meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

À minha professora orientadora Luciana Fortes Ribas, pelo acompanhamento e orientação.

Ao Curso de Ciências Biológicas, do Setor de Biológicas da Universidade Federal do Paraná, na pessoa de sua coordenadora Profa. Dra. Claudia Maria Sallai Tanhoffer, pelo apoio recebido.

“Somente quando for cortada a última árvore, poluído o último rio, pescado o último peixe, é que o homem vai perceber que não pode comer dinheiro”.

Greenpeace

RESUMO

A família Orchidaceae é uma das maiores famílias de plantas existentes e suas representantes são muito conhecidas por seu uso como plantas ornamentais e pela beleza de suas flores. Muitas espécies dessa família estão ameaçadas de extinção devido ao seu uso comercial e também pela destruição do seu ambiente natural. A espécie *Hadrolaelia grandis* é uma erva epífita, nativa e endêmica do Brasil com distribuição na Mata Atlântica dos estados do Espírito Santo e Bahia que está classificada como vulnerável pelo Centro Nacional de Conservação da Flora. Como a propagação natural das orquídeas é um processo muito lento e com uma baixa taxa de sucesso, a propagação *in vitro* dessas espécies é bastante utilizada. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o melhor tipo de explante e regulador vegetal para estabelecer um protocolo de organogênese direta de *H. grandis*. Protocormos e folhas obtidos após 7 a 10 meses da germinação *in vitro* foram cultivados em meio de cultura MS sem reguladores vegetais e meio MS suplementado com 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6 μM de 6-benzilaminopurina (BAP), combinada ou não com 2,2 e 4,4 μM de ácido α -naftalenoacético (ANA). A cada 30 dias foram avaliadas: a porcentagem de explantes com brotações, o número médio de brotações por explante e a porcentagem de necrose. A melhor resposta de indução de protocormos com folhas foi obtida em meio com 2,2 μM de BAP (33,33% e 1,28 brotações por explante) e de indução de folhas inteiras em meio sem regulador vegetal (30,00% e 1,00 brotação por explante). A adição de ANA às concentrações de BAP testadas não foi eficiente porque aumentou a porcentagem de necrose. Os explantes apresentaram pouca resposta no cultivo inicial, sendo necessário subcultivos sucessivos para aumentar a taxa de regeneração de brotações e a realização de novos experimentos com novas concentrações de reguladores vegetais e explantes mais jovens para estabelecer um protocolo de organogênese de *H. grandis*.

Palavras-chave: Orchidaceae, cultivo *in vitro*, explante juvenil, micropropagação.

ABSTRACT

The orchid family is one of the largest families of existing plants and their representatives are well known for their use as ornamental plants and the beauty of their flowers. Several species of this family are endangered due to their commercial use as well as the destruction of their natural environment. The species *Hadrolaelia grandis* is an epiphyte herb, native and endemic from Brazil, with distribution through the Atlantic Forest in the states of Espírito Santo and Bahia, and she is classified as vulnerable by the National Flora Conservation Center. The natural propagation of orchids is a very slow process and has a low success rate, so *in vitro* propagation of these species is widely used. The objective of this work was evaluate the best type of explant and plant growth regulator to establish a direct organogenesis protocol for *H. grandis*. Protocorm and leaves obtained after 7 to 10 months from *in vitro* germination, were cultured on MS medium without plant growth regulator or supplemented with 2.2; 4.4; 8.8 and 17.6 μM of 6-benzylaminopurine (BAP), combined or not with 2.2 and 4.4 μM of α -naphthalene acetic acid (ANA). Every 30 days were evaluated: the percentage of explants with shoots, the average number of shoots per explant and the percentage of necrosis. The best response from induction of protocorm with two leaves was obtained in medium with 2.2 μM BAP (33.33% and 1.28 shoots per explant), and from induction of entire leaves, in medium without growth regulators (30,00 % and 1,00 shoot per explant) . The addition of ANA to the BAP tested concentrations was not effective because it increased the percentage of necrosis. The explants showed little response in the initial culture, requiring successive subcultures to increase shooting regeneration rate and execution of new experiments with new concentrations of plant growth regulators and younger explants to establish an organogenesis protocol for *H. grandis*.

Keywords: Orchidaceae, *in vitro* culture, juvenile explants, micropropagation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 A ESPÉCIE <i>Hadrolaelia grandis</i> (Lindl. & Paxton) Chiron & V.P. Castro	14
2.2 MICROPROPAGAÇÃO	14
2.3 ORGANOGÊNESE	15
2.4 MEIOS DE CULTURA	16
2.5 REGULADORES VEGETAIS	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	17
3.2 ORGANOGÊNESE DIRETA	17
3.2.1 Protocormos com duas folhas	17
3.2.2 Folhas.....	17
3.3 MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO	18
3.4 AVALIAÇÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 PROTOCORMOS COM DUAS FOLHAS	19
4.2 FOLHAS	21
5 CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS	25
FIGURAS	28

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1-** *Hadrolaelia grandis*. A- aspecto da flor; Material usado como fonte de explantes: B- Brotações oriundas de sementes germinadas por 10 meses em meio MS; C- protocormos; D- folha. (Barras: 1 cm)28
- FIGURA 2** Brotações regeneradas a partir de protocormos de *Hadrolaelia grandis*, após 60 dias de cultivo. A e B – meio MS, sem adição de reguladores vegetais; C - cultivo em meio MS, acrescido de 2,2 μM de BAP; D- cultivo em meio MS, acrescido de 2,2 μM de BAP e 4,4 μM de ANA29
- FIGURA 3-** Regeneração de brotações de *Hadrolaelia grandis*, após 60 dias de cultivo. A- folhas cultivadas em meio MS, acrescido de 2,2 μM de BAP; B- folhas cultivadas em meio MS, acrescido de 4,4 μM de BAP; C- folhas induzidas à regeneração em meio MS, acrescido de 2,2 μM de BAP e 4,4 μM de ANA.....30

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Porcentagem de explantes com brotações, número médio de brotações por explante e porcentagem de necrose de protocormos de <i>Hadrolaelia grandis</i> , cultivados em meio MS, com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), após 60 dias.....	19
TABELA 2 - Porcentagem de explantes com brotações, número médio de brotações por explante e porcentagem de necrose de protocormos de <i>Hadrolaelia grandis</i> , cultivados em meio MS, com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido α -naftalenoacético (ANA), após 60 dias.....	20
TABELA 3 - Porcentagem de explantes com brotações, número médio de brotações por explante e porcentagem de necrose de folhas inteiras de <i>Hadrolaelia grandis</i> , cultivados em meio MS, com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), após 60 dias.....	21
TABELA 4 - Porcentagem de explantes com brotações, número médio de brotações por explante e porcentagem de necrose de folhas inteiras de <i>Hadrolaelia grandis</i> , cultivados em meio MS, com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido α -naftalenoacético (ANA), após 60 dias.....	23

1 INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é uma das maiores famílias de plantas existentes e suas representantes são muito conhecidas por seu uso como plantas ornamentais, devido a beleza de suas flores. O Brasil possui uma das maiores floras da família Orchidaceae do mundo, representadas por 240 gêneros e 2443 espécies, muitas epífitas e endêmicas (BARROS et al., 2013). Muitas espécies de orquídeas estão ameaçadas de extinção devido ao seu uso comercial e também pela destruição do seu ambiente natural.

O gênero *Laelia* é de grande importância para o agronegócio florícola mundial, devido principalmente, a ampla capacidade de recombinação genética, beleza, forma, tamanho e durabilidade de suas flores (CORDEIRO et al., 2011). As espécies desse e de outros gêneros da família Orchidaceae são muito usadas como plantas ornamentais o que lhes confere grande importância econômica. O gênero *Hadrolaelia* possui vários sinônimos, e atualmente ainda existem controvérsias na classificação taxonômica, pois durante muito tempo estava sendo usado o gênero *Laelia* (SUZUKI et al., 2009). O presente trabalho adotou a classificação de Chiron e Castro Neto (2002) para as espécies desse gênero, denominada como *Hadrolaelia grandis*. Essa espécie é uma erva epífita, nativa e endêmica do Brasil, com distribuição na Mata Atlântica dos estados do Espírito Santo e Bahia. Possui haste de florescência de 30 cm, com bainha basal, apresentando entre dois e cinco flores. As pétalas e sépalas são de coloração amarela esverdeada para alaranjada (CULLEN et al., 2011). Por ser uma espécie usada como planta ornamental e pela destruição de seu ambiente natural é classificada como vulnerável pelo Centro Nacional de Conservação da Flora (PRIETO, 2012).

A propagação natural das orquídeas é um processo lento, apesar de possuírem milhões de sementes em uma cápsula, somente 5% germinam (FARIA et al., 2006). Essa pequena taxa de germinação ocorre devido ao fato das sementes de orquídeas serem muito pequenas e não possuírem reservas, precisando de uma associação micorrízica para germinar. Mesmo depois das sementes formadas, pode levar muitos anos para a orquídea crescer e eventualmente florescer demorando muito para verificar o sucesso da reprodução (VYAS et al., 2010).

Durante os últimos anos, as técnicas de cultura de tecidos estão sendo amplamente exploradas, não só para a propagação rápida e em grande escala de

orquídeas, como também para a conservação *ex situ* (NAYAK et al., 1997). A micropropagação é um sistema de propagação *in vitro* que permite a produção de muitos clones de uma planta a partir de uma única célula ou um pequeno pedaço de tecido vegetal. Essa técnica possui inúmeras vantagens, em se tratando de orquídeas, pois produz uma grande quantidade de plantas com um crescimento rápido, o que não ocorre com a propagação natural dessas plantas. Além disso, a propagação *in vitro* tem contribuído para salvar muitas espécies de orquídeas da extinção (FARIA et al., 2006).

A micropropagação vegetal pode ser obtida de várias maneiras, dentre elas a organogênese direta, que se dá a partir do surgimento direto de gemas a partir de tecidos que apresentam potencial morfogenético na planta *in vivo*, mas que em geral não se expressam. A organogênese direta é um processo que permite a multiplicação em grande quantidade, mantendo a identidade genética do indivíduo propagado (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). O uso de reguladores vegetais como citocininas e auxinas favorece a resposta dos explantes (MATHEWS & RAO, 1985). A citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e a auxina ácido α -naftalenoacético (ANA), foram testadas com bons resultados para a propagação *in vitro* de diversas espécies de orquídeas como *Dendrobium* (MARTIN & MADASSERY, 2005), *Dayaoshania cotinifolia* (YANG, et al., 2014) e *Epidendrum secundum* (FERREIRA et al., 2015).

Explantes foliares e protocormos vêm sendo utilizados para micropropagação de diversas espécies de orquídeas como *Vanda TMA X Vanda Miss Joaquim* (MATHEWS & RAO, 1985), *Acampe praemorsa* (NAYAK, et al., 1997), *Renanthera* (WU, et al., 2012), e *Dayaoshania cotinifolia* (YANG, et al., 2014).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o melhor tipo de explante (protocormos com folhas ou folhas inteiras) e a melhor concentração de 6-benzilaminopurina (BAP), isolada ou combinada com ácido α -naftalenoacético (ANA) na indução de brotações de *Hadrolaelia grandis*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A ESPÉCIE *Hadrolaelia grandis* (Lindl. & Paxton) Chiron & V.P. Castro

Hadrolaelia grandis é uma espécie ornamental da família Orchidaceae (FIGURA 1A), com distribuição geográfica relativamente ampla ao longo da costa Atlântica dos Estados do Espírito Santo e Bahia (CULLEN et al., 2011). É uma planta epífita adaptada a áreas sombreadas e a sua capacidade de formar grandes colônias sugere que possa haver indivíduos bastante longevos, com estimativas de que o tempo de geração seja de pelo menos 10 anos (PRIETO, 2012).

Com o rápido desmatamento de seus habitats e seu longo tempo de geração, suspeita-se que um período de 30 anos seja suficiente para que a espécie sofra uma redução populacional de 30% no mínimo, e por esses motivos ela é considerada vulnerável (PRIETO, 2012).

2.2 MICROPROPAGAÇÃO

A micropropagação ou propagação *in vitro* é uma técnica de cultura de tecido que oferece condições para se obter plantas de difícil propagação e de ciclos de vida longa, em um menor espaço de tempo. Esta técnica tem como principal finalidade induzir o crescimento e o desenvolvimento do explante, em condições de iluminação e temperatura controlada e mediante a adição de substâncias de naturezas diversas no meio de cultura, principalmente reguladores vegetais (CARVALHO, 1999). A micropropagação pode ser obtida por meio da proliferação de gemas axilares, multiplicação mediante indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta ou via embriogênese somática (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Esta técnica tem tido sucesso, graças à totipotência característica das células vegetais. Em outras palavras, isso significa dizer que toda célula vegetal viva, que possua um núcleo, possui a capacidade de fielmente reproduzir a morfologia da planta inteira da qual se origina (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). O domínio dessa técnica é de extrema importância para acelerar o desenvolvimento de plantas com o crescimento lento, como as orquídeas. A micropropagação oferece assim, inúmeras vantagens

tais como a produção rápida de materiais propagativos, livres de doenças e pragas, com alta qualidade genética e em tempo reduzido. Por meio dessa técnica, é possível produzir altas quantidades de plantas ao longo de todo ano, com condições controladas (ROCHA, 2009).

A micropropagação é amplamente utilizada para a propagação rápida e em larga escala de orquídeas. Diferentes protocolos vêm sendo desenvolvidos para a propagação de várias espécies de orquídeas, por meio do cultivo *in vitro* de várias partes, tais como, raiz, ápice caulinar, folha e inflorescência (CHUGH et al, 2009).

2.3 ORGANOGÊNESE

Organogênese é uma rota de desenvolvimento na qual, órgãos vegetais (brotos, raízes ou ambos) são induzidos à diferenciação a partir de uma ou várias células (ANDRADE, 2002). A organogênese pode ser direta ou indireta. A organogênese direta se dá a partir do surgimento direto de gemas a partir de tecidos que apresentam potencial morfogênético na planta *in vivo*, mas que em geral não se expressam. A organogênese direta é um processo que permite a multiplicação em grande quantidade, mantendo a identidade genética do indivíduo propagado (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). A organogênese indireta ocorre quando o processo de regeneração de gemas é precedido pela formação de calo (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). A obtenção de organogênese *in vitro* é um processo onde são testados para cada espécie, ou até para cada variedade dentro de uma mesma espécie, condições como: fonte de explante; composição mineral do meio de cultura; balanço hormonal e condições ambientais (PERES, 2002).

Vários tipos de explantes podem ser utilizados com a técnica de organogênese, para a propagação de orquídeas, tais como: segmentos nodais, folhas, ápices radiculares (NG e SALEH, 2011). Os explantes foliares representam uma alternativa eficiente para micropropagação de orquídeas, pois são fáceis de se obter (FERREIRA et al., 2015). Além disso, esses explantes não necessitam do sacrifício da planta mãe e não dependem das estações do ano, como por exemplo, os explantes de inflorescência (CHUGH, et al., 2009).

2.4 MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura consistem basicamente, de uma mistura balanceada de macronutrientes e micronutrientes, carboidratos, fontes orgânicas de nitrogênio, vitaminas e reguladores de crescimento (QUISEN; ÂNGELO, 2008).

Os minerais inclusos na maioria dos meios de cultura foram definidos por White, em 1951 e utilizados durante anos como meio básico para a cultura de uma grande variedade de tecidos de várias espécies. O meio MS de Murashige & Skoog (1962) foi desenvolvido a partir de testes, com folha de tabaco e vem sendo utilizado na cultura de diversas espécies (CALDAS et al., 1998).

2.5 REGULADORES VEGETAIS

Os reguladores vegetais podem ser definidos como substâncias naturais ou sintéticas que podem ser aplicadas diretamente nas plantas para alterar os processos vitais ou estruturais (LACA-BUENDIA, 1989). O uso dos reguladores vem sendo estudado a fim de melhorar tanto quantitativamente quanto qualitativamente a produção de plantas em culturas.

Para uma planta se desenvolver, é fundamental a presença de controladores de crescimento, os reguladores vegetais (citocininas, giberelinas, auxinas, etileno e ácido abscísico) considerados os reguladores químicos das plantas (CARVALHO et al., 2006).

O efeito de cada um dos reguladores no desenvolvimento da planta depende da espécie utilizada; de qual parte da planta foi aplicado; do estágio de crescimento da planta; das condições fisiológicas das plantas; da concentração hormonal utilizada e também da interação entre os hormônios; estrutura química do regulador, dentre outros (CID, 2000; TAGLIACOZZO, 1998).

A auxina -naftalenoacético (ANA) é utilizada para induzir o desenvolvimento de nós, formação de calos e desenvolvimento de raízes adventícias e as citocininas, como por exemplo, 6-benzilaminopurina (BAP) estimulam a divisão celular, induzem a formação de brotos adventícios e inibem a formação de raízes (CARVALHO, 1999).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Micropropagação Vegetal do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná.

3.1 MATERIAL VEGETAL

Sementes armazenadas em freezer nas temperaturas de - 20 °C e - 80 °C por um período de 30 meses foram desinfestadas e germinadas nos meios de cultura Murashige & Skoog (1962) (MS), Knudson C (1946) (KC) e Vacin & Went (1949) (VW). Após 7 a 10 meses de cultivo, os protocormos contendo um par de folhas (FIGURA 1B) foram utilizados como fonte de explantes.

3.2 ORGANOGÊNESE DIRETA

3.2.1 Protocormos com duas folhas

Os explantes oriundos de sementes germinadas por sete meses em meio VW ou KC, medindo aproximadamente 3 mm de altura (FIGURA 1C) foram inoculados em placas de petri contendo o meio MS, suplementado com 0; 2,2; 4,4 e 8,8 μM de BAP isolada ou combinada com 0; 2,2 e 4,4 μM de ANA. Foram inoculados 12 explantes por placa de petri e seis repetições, totalizando 72 explantes por tratamento.

3.2.2 Folhas

Protocormos com duas folhas, medindo 7 mm de comprimento, após 10 meses da germinação *in vitro* foram cultivados no meio MS, contendo BAP (4,4 e 8,8 μM). Após dois subcultivos para meio MS, contendo as mesmas concentrações de BAP, as folhas inteiras (FIGURA 1D) foram retiradas (5 mm de comprimento) e utilizadas como explantes. Nesse experimento, o meio MS foi suplementado com: 0;

2,2; 4,4; 8,8; 17,6 μM de BAP, isolado ou combinado com ANA (0; 2,2 e 4,4 μM).

Foram inoculadas 10 folhas inteiras por placa de petri e seis repetições, totalizando 60 folhas por tratamento. Os tratamentos foram colocados no escuro por um mês e depois transferidos para fotoperíodo de 16 horas.

3.3 MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

O meio de cultura utilizado para todos os experimentos foi o MS, adicionado de 5,8 g.L^{-1} de ágar Himedia®. Os meios tiveram o pH ajustado em 5,8 com NaOH 1N ou HCL 1N, antes de serem autoclavados a 120°C por 20 minutos. Os experimentos de indução de estruturas semelhantes à protocormos (ESPs) foram realizados em placas de Petri (10 cm de diâmetro) contendo 40 ml de meio de cultura.

As culturas ficaram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$ durante o dia e $19\pm 2^\circ\text{C}$ durante a noite, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $40 \text{ mol. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

3.4 AVALIAÇÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram avaliados, considerando as seguintes variáveis: porcentagem de explantes com brotações, número médio de brotações por explante e porcentagem de necrose dos explantes, após 60 dias.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso. Os dados obtidos foram submetidos a análise de homogeneidade pelo teste de Bartlett e análise de variância. Quando houve diferença significativa, a comparação de médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico Assistat.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PROTOCORMOS COM DUAS FOLHAS

Os dados da Tabela 1 indicaram pouca resposta de indução de brotações nos explantes e não houve diferença significativa entre os tratamentos para todas as variáveis avaliadas, após 60 dias. Na ausência de regulador vegetal, ocorreu a mais baixa porcentagem de explantes com brotações e também de necrose (FIGURAS 2A e 2B). No entanto, observou-se, que o tratamento com a menor concentração de BAP (2,2 μM) apresentou maior porcentagem de explantes com brotações (33,33%) (FIGURA 2C). Silva (2003), também não obteve nenhum resultado significativo para a multiplicação de *Brassiocattleya Pastoral* x *Laeliocattleya Amber Glow* com BAP.

TABELA 1: Porcentagem de explantes com brotações, número médio de brotações por explante e porcentagem de necrose de protocormos de *Hadrolaelia grandis*, cultivados em meio MS, com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), após 60 dias.

Concentração BAP/ (μM)	Explantes com Brotações (%)	Nº médio de brotações por explante	Necrose (%)
0	18,05	1,32	12,49
2,2	33,33	1,28	16,67
4,4	20,83	1,16	22,22
8,8	23,61	1,21	18,06

Os valores obtidos de porcentagem de explantes com brotações e de número médio de brotações por explantes na indução de protocormos em todos os tratamentos, foram muito baixos após o cultivo inicial e isso pode ter ocorrido devido à idade dos protocormos ou até mesmo das concentrações de BAP testadas. Ferreira et al. (2015) obtiveram melhores resultados com *Epidendrum secundum*, utilizando protocormos de dois meses de idade, cultivados em meio WPM, com diferentes concentrações de BAP (0; 1,0; 2,5; 5; 10; 20 e 40 μM). A porcentagem de regeneração de protocormos variou entre 87 a 100%, e o número médio de ESPS por explante responsivo foi de 2,2 a 4,8. No presente trabalho, os protocormos utilizados tinham 10 meses e já apresentavam folhas desenvolvidas, confirmando com isso que a idade do explante pode ter grande influência nas respostas de regeneração de brotações. Nayak et al. (1997) também obtiveram bons resultados em perfilração de brotações em meio MS, acrescido com concentrações mais

elevadas de BAP (4,4; 22,0 e 44,0 μM) para as espécies *Cymbidium aloifolium*, *Dendrobium aphyllum* e *Dendrobium moschatum*. A porcentagem de proliferação de brotações foi de 83,6% para *C. aloifolium* com a adição de 22,0 μM de BAP; 81,6% para *D. aphyllum* e 78,5% para *D. moschatum* com 44,0 μM de BAP.

No experimento de indução de protocormos utilizando BAP acrescido de ANA, verificou-se diferença significativa entre os tratamentos somente para a porcentagem de necrose (TABELA 2). Os explantes cultivados em meios com menores concentrações de BAP e sem acréscimo de ANA apresentaram melhores respostas, quando comparados com os cultivados em meios com maior concentração de BAP e ANA. As altas concentrações de ANA combinadas com altas concentrações de BAP promoveram um aumento na porcentagem de necrose. O tratamento com 2,2 μM de BAP e 4,4 μM de ANA apresentou a maior porcentagem de explantes com brotações (31,94%) e o maior número médio de brotações por explante (1,58) (FIGURA 2D), apesar de não haver diferença significativa entre os tratamentos.

TABELA 2: Porcentagem de explantes com brotações, número médio de brotações por explante e porcentagem de necrose de protocormos de *Hadrolaelia grandis*, cultivados em meio MS, com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido α -naftalenoacético (ANA), após 60 dias.

Concentração BAP e ANA (μM)	Explantes com Brotações (%)	Nº médio de brotações por explante	Necrose (%)
0 / 0	25,00	1,25	6,94 b
2,2 / 0	23,61	1,39	5,55 b
4,4 / 0	24,99	1,43	13,88ab
2,2 / 2,2	15,27	1,26	25,00 a
2,2 / 4,4	31,94	1,58	26,38 a
4,4 / 2,2	22,22	1,36	20,83 ab
4,4 / 4,4	26,39	1,18	29,16 a

* Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise conjunta dos resultados dos experimentos com BAP isolado ou combinado com ANA mostraram que a adição de ANA não interferiu na regeneração de brotações e aumentou a necrose dos explantes. Nayak et al. (1997) obtiveram resultados superiores aos de *H. grandis*, com regeneração de brotações de *C. aloifolium*, *D. aphyllum* e *D. moschatum* utilizando concentrações mais elevadas de BAP (22,0 e 44,0 μM) combinada com ANA (5,4 μM). *C. aloifolium* obteve 83,6% de regeneração de brotações no tratamento com BAP (22,0 μM) e 83,5% na mesma concentração de BAP, acrescida de 5,4 μM de ANA; e as espécies *D. aphyllum* e *D. moschatum* obtiveram 81,6% e 78,5% respectivamente no tratamento com BAP

(44,0 μM) e 81,5% e 78,6% na mesma concentração de BAP com 5,4 μM de ANA.

Os resultados obtidos no presente trabalho, para regeneração de protocormos de *H. grandis*, mostraram que os tratamentos constituídos somente de BAP são mais viáveis, pois com adição de ANA, aumentou a porcentagem de necrose.

Os resultados obtidos com *H. grandis* foram preliminares, pois foi realizado só um cultivo nos meios contendo reguladores vegetais, sendo necessário realizar subcultivos sucessivos para verificar se aumenta o número médio de brotos. Além disso, também é importante testar outras concentrações de BAP, ou outras citocininas e explantes mais jovens.

4.2 FOLHAS

O experimento de indução de folhas inteiras utilizando BAP apresentou diferença significativa entre os tratamentos somente para porcentagem de explantes com brotações, como mostram os dados da Tabela 3. O tratamento sem adição do regulador vegetal apresentou melhor resultado quando comparado com o 2,2 μM de BAP (FIGURA 3A). Observou-se, um aumento da porcentagem de necrose e do número médio de brotações por explante nas concentrações de 4,4 μM de BAP (FIGURA 3B) a 17,6 μM de BAP (TABELA 3).

TABELA3: Porcentagem de explantes com brotações, número médio de brotações por explante e porcentagem de necrose de folhas inteiras de *Hadrolaelia grandis*, cultivados em meio MS, com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), após 60 dias.

Concentração BAP (μM)	Explantes com Brotações (%)	Nº médio de brotações por explante	Necrose (%)
0	30,00 a	1,00	26,67
2,2	6,67 b	1,10	25,00
4,4	16,67 ab	1,60	50,00
8,8	11,67 ab	1,46	46,67
17,6	11,67 ab	1,67	45,00

* Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ao contrário dos resultados preliminares obtidos no presente trabalho, Murthy e Pyati (2001) obtiveram protocormos a partir de segmentos de folhas jovens de plantas crescidas *in vitro* de *Aerides maculosa* Lindl., em meio de cultura MS suplementado com 8,8 μM de BAP, concentração mais elevada do que às testadas no presente estudo. Nayak et.al. (1997) também obtiveram resultados diferentes com regeneração de brotos a partir de explantes foliares de *Acampe praemorsa*, no

qual a adição de citocinina foi essencial para a indução de brotos.

Os resultados obtidos no presente trabalho para porcentagem de explantes com brotações (30%) e número médio de brotações por explante (1,5) apresentaram valores baixos, que pode ser explicado pela idade das folhas usadas como explantes. Além do estímulo químico a que são submetidos, os explantes foliares tem o início de sua atividade meristemática diretamente relacionada com a juvenilidade do tecido doador (KAUR & BUTHANI, 2009). Ferreira et al. (2015) obtiveram melhores resultados na regeneração de PLBs a partir de folhas jovens (dois meses), do que com folhas mais velhas (seis meses) de *Epidendrum secundum*. A melhor resposta para folhas jovens ocorreu em meio WPM com 1 μM de BAP (70% de regeneração e 1,9 brotações por explante). Para as folhas mais velhas (seis meses), a maior porcentagem de resposta ocorreu com 2,5 μM de BAP (42% de regeneração de brotações e 1,7 brotos por explante), confirmando com isso que a idade da folha interfere nas respostas *in vitro*. Yang et al. (2014) obtiveram resultados superiores aos de *H. grandis*, com organogênese de brotos a partir de explantes foliares para *Dayaoshania cotinifolia*, em meio MS suplementado com 1,0; 3,0 e 5,0 μM de BAP, onde a porcentagem de explantes responsivos variaram entre 80 a 95,4%.

Os resultados do experimento de folhas indicaram diferença estatística significativa entre os tratamentos para a variável porcentagem de necrose, onde os tratamentos sem reguladores vegetais e com 2,2 μM de BAP apresentaram melhores resultados do que os tratamentos de BAP, combinados com 4,4 μM de ANA (FIGURA 3C; TABELA 4). Segundo VENTURA (2002), o processo de organogênese foi mais eficiente quando os explantes primários e secundários foram transferidos para um meio de cultura sem reguladores vegetais. Resultados similares também ocorreram no estudo de Martin e Madassery (2006), com explantes foliares de *Dendrobium* Sonia 17 e 28, onde a eficácia de indução de brotos não melhorou com combinações de BAP e ANA.

As variáveis: porcentagem de explantes com brotações e número médio de brotações por explante não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. Entretanto, observou-se que o tratamento sem adição de regulador vegetal apresentou a maior porcentagem de explantes com brotações e que os tratamentos com 2,2 μM de BAP, acrescidos de 2,2 e 4,4 μM de ANA apresentaram maior número médio de brotações por explante. Entretanto, esses valores foram

muito baixos, provavelmente devido à idade das folhas. No entanto, para outras espécies, a combinação de BAP e ANA tem sido eficiente em concentrações diferentes das testadas para *H. grandis*. Wu et al. (2012) cultivaram explantes foliares de *Renanthera Tom Thumb 'Qilin'*, em meio VW suplementado com 22 μM de BAP e 5,37 μM de ANA (77,3% de brotações). Concentrações superiores às testadas para *H. grandis* também foram eficientes para explantes foliares de *Acampe praemorsa*, cultivados em meio com 44 μM de BAP e 5,37 μM de ANA (72,5% de regeneração de brotos) (NAYAK et al., 1997).

TABELA 4: Porcentagem de explantes com brotações, número médio de brotações por explante e porcentagem de necrose de folhas inteiras de *Hadrolaelia grandis*, cultivados em meio MS, com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido α -naftalenoacético (ANA), após 60 dias.

Concentração BAP e ANA (μM)	Explantes com Brotações (%)	Nº médio de brotações por explante	Necrose (%)
0 / 0	25,00	1,53	33,33 b
2,2 / 0	18,33	1,19	30,00 b
4,4 / 0	23,33	1,48	53,33ab
2,2 / 2,2	21,67	1,76	46,67ab
2,2 / 4,4	21,67	1,89	73,33 a
4,4 / 2,2	18,33	1,35	61,67ab
4,4 / 4,4	10,00	1,62	83,33 a

* Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise conjunta dos dados permitiu concluir que para indução de protocormos e de folhas inteiras de *H. grandis*, a adição de ANA não se mostrou eficaz para otimizar os tratamentos suplementados com BAP e aumentou a porcentagem de necrose dos explantes. Entretanto, os resultados mostraram valores muito baixos em todos os experimentos, o que pode ser devido à idade dos explantes como corroboram alguns trabalhos citados anteriormente.

Como o presente trabalho, é um estudo preliminar é necessário fazer subcultivos subsequentes para os mesmos tratamentos, para confirmar ou obter melhores resultados, bem como repetir os experimentos, para estabelecer um protocolo de micropropagação de *H. grandis* a partir de protocormos e folhas. Além disso, é necessário realizar os experimentos utilizando explantes mais jovens e outras concentrações de BAP e ANA.

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho foi um estudo preliminar de micropropagação de *Hadrolaelia grandis* utilizando protocormos e folhas como fonte de explantes. Os explantes testados são promissores, mas constatou-se que é necessário a realização subcultivos com os reguladores vegetais, experimentos com novas concentrações dos reguladores vegetais e a utilização de explantes mais jovens para se obter melhores resultados e poder estabelecer um protocolo de micropropagação para a espécie *Hadrolaelia grandis*.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, S.R.M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina, Embrapa Cerrado, Documentos 58, 2002.

BARROS, F. de; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N.; PESSOA, E.M.; FORSTER, W.; MENINI, L.; FURTADO, S.G.; NARDY, C.; AZEVEDO, C.O.; GUIMARÃES, L.R.S. **Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB64706>>. Acesso em: 25 de Maio de 2015.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, Embrapa-SPI, v.1, p.87-132, 1998.

CARVALHO, J. M. F. C. de. **Técnicas de micropropagação**. Campina Grande: Embrapa Algodão, Documentos 64, p. 39, 1999.

CARVALHO, J.M.F.C. **Considerações Gerais Sobre Organogênese**. Campina Grande: Embrapa Algodão, Documentos 150, 2006.

CID, L.P.B. Citocininas. In: CID, L.P.B. **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 55-77, 2000.

CHIRON, G.R; NETO, V.P.C. Révision des espèces brésiliennes du genre *Laelia* Lindley. 2002. Disponível em: <http://www.researchgate.net/profile/Guy_Chiron/publication/268517551_Rvision_des_espces_brsiliennes_du_genre_Laelia_Lindley/links/546ef0e80cf29806ec2ec586.pdf>. Acesso em: 25 de Maio de 2015

CID, L. P. B; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID, L. P.B. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 15-49, 2010.

CHUGH, S; GUHA, S; RAO, R.I. Micropropagation of orchids: A review on the potential of diferente explants. **Scientia Horticulturae**, v.122, p.507-520, 2009.

FARIA, R. T. de; DALIO, R. J. D.; UNEMOTO, L. K.; SILVA, G. L. da. Propagação in vitro de *Oncidium baueri* Lindl. (Orchidaceae) sem uso de ágar. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 71-74, 2006.

FERREIRA, D.L; SMIDT, E.C; RIBAS, L.L.F. Efficient micropropagation of *Epidendrum secundum* Jacq. From leaves and protocorms. **African Journal of Biotechnology**. v.14, p.1122-1128, 2015.

GRATTAPAGLIA, D; MACHADO, M.A. Micropropagação In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: **Embrapa/SPI**, v.1, p. 183-260, 1998.

KAUR,S.; BUTHANI, K.K. In vitro propagation of *Vanda testacea* (Lindl) Reichb.f.- a rare orchid of high medicinal value. **Plant Tiss. Cult. Biotechnol**, v.19, p.1-7, 2009.

LACA-BUENDIA, J.P.C. Efeito de doses de reguladores de crescimento no algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.1, p.109-113, 1989.

MARTIN,K.P; MADASSERY, J. Rapid in vitro propagation of *Dendrobium* hybrids through direct shoot formation from foliar explants, and protocorm-like bodies. **Scientia Horticulturae**, 108, 95-99, 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

MURTHY,H.N.; PYATI,A.N. Micropropagation of *Aerides maculosum* Lindl. **In vitro Cell. Dev. Biol- Plant**. V.37, p.223-226, 2001.

NAYAK,N.R; PATNAIK,S.; RATH,S.P. Direct shoot regeneration from foliar explants of an epiphytic orchid, *Acampe praemorsa* (Roxb.) Blatter and McCann. **Plant Cell Reports**, v.16, p.583-586, 1997.

NAYAK, N.R; RATH, S.P; PATNAIK, S. *In vitro* propagation of three epiphytic orchids, *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fish. And *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) Sw. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation. **Scientia Horticulturae**, v.71, p.243-250, 1997.

NG,C.Y; SALEH,N.M. *In Vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchid through formation of protocorm-like-bodies. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*105: 193-202, 2011. In: FERREIRA,D.L; SMIDT,E.C; RIBAS,L.L.F. **Efficient micropropagation of *Epidendrum secundum* Jacq. From leaves and protocorms.** African Journal os Biotechnology. v.14.p.1122-1128, 2015.

PERES,L.E.P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biociência**, v.4, n.25, p.44-48, 2002.

PRIETO,P.V. ***Hadrolaelia grandis* (Lindl.) Chiron & V.P.Castro**. Centro Nacional de Conservação da Flora, 2012. Disponível em: <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Hadrolaelia%20grandis>.

QUISEN, R.C; ÂNGELO, P.C.S. **Manual de Procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Documentos 61. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008.

RAO, P.S; MATHEWS, V.H. *In vitro* Culture of *Vanda* Hybrid (*Vanda* TMA X *Vanda* Miss Joaquim). II. Studies on Seedling Explants. **Proc.Indian natn. Sci. Acad.** V.4, p.496-504, 1985.

ROCHA, H. S. Biofábricas: estrutura física e organização. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S. (Ed.). **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p. 121-152, 2009.

SILVA, E.F. **Multiplicação e crescimento in vitro de orquídea Brassiocattleya pastoral X Laeliocattleya amber glow**. 62 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Lavras, 2003.

SUZUKI, R.M.; MOREIRA, V.C.; NAKABASHI, M.; FERREIRA, W.M. Estudo de germinação e crescimento *in vitro* de *Hadrolaelia tenebrosa* (Rolfe) Chiron & V.P. Castro (Orchidaceae), uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção. **Hoehnea**. v.36, p.657-666, 2009.

TAGLIACOZZO, G.M.D. Fitormônios e seus efeitos biológicos *in vivo* e *in vitro*. In: TOMBOLATO, A.F.C.; COSTA, A.M.M. **Micropropagação em plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agronômico, p. 58- 62, 1998.

VENTURA, G.M.; DIAS, J.M.M.; TEIXEIRA, L.S.; CARVALHO, S.V.; MOTOIKE, Y.S.; NOVAIS, F.R.; CECON, R.P. Organogênese *in vitro* a partir de gemas apicais e auxiliares de plantas adultas de orquídeas do grupo *Cattleya*. **Revista Ceres**, v.47, n.286, p.613-628, 2002.

WU, K; ZENG, S; SILVA, J.A.T; CHEN, Z; ZHANG, J. Efficient regeneration of *Renanthera* Tom Thumb 'Qilin' from leaf explants. **Scientia Horticulturae**, v.135, p.194-201, 2012.

YANG, G; et.al. Shoot organogenesis from leaf explants of *Dayaoshania cotinifolia* W. T. Wang. **In Vitro Cell.Dev.Biol.** v.50, p.451-457, 2014.

FIGURAS



FIGURA 1: *Hadrolaelia grandis*. A- aspecto da flor; Material usado como fonte de explantes: B- Brotações oriundas de sementes germinadas por 10 meses em meio MS; C- protocormos; D- folha. (Barras: 1 cm)

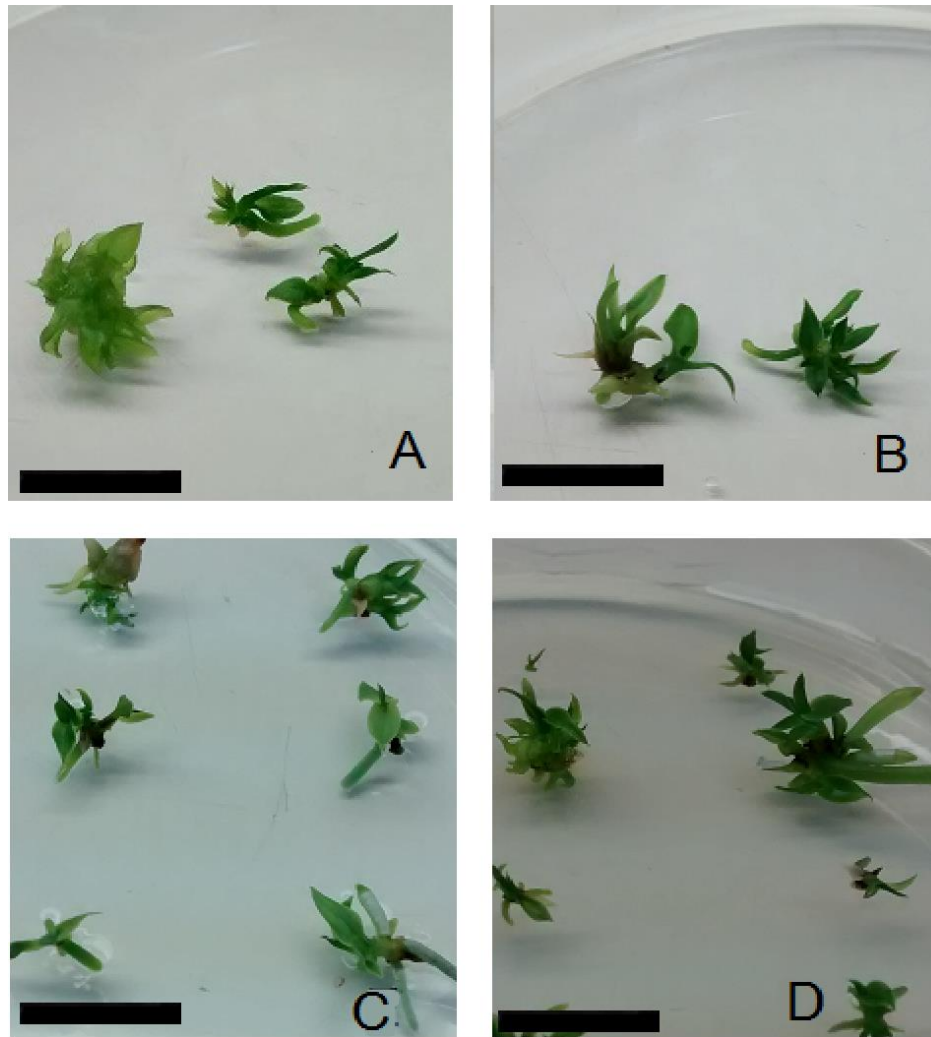


FIGURA 2: Brotações regeneradas a partir de protocormos de *Hadrolaelia grandis*, após 60 dias de cultivo. A e B – meio MS sem adição de reguladores vegetais; C - cultivo em meio MS, acrescido de 2,2 μM de BAP; D- cultivo em meio MS, acrescido de 2,2 μM de BAP e 4,4 μM de ANA. (Barras: 1cm).

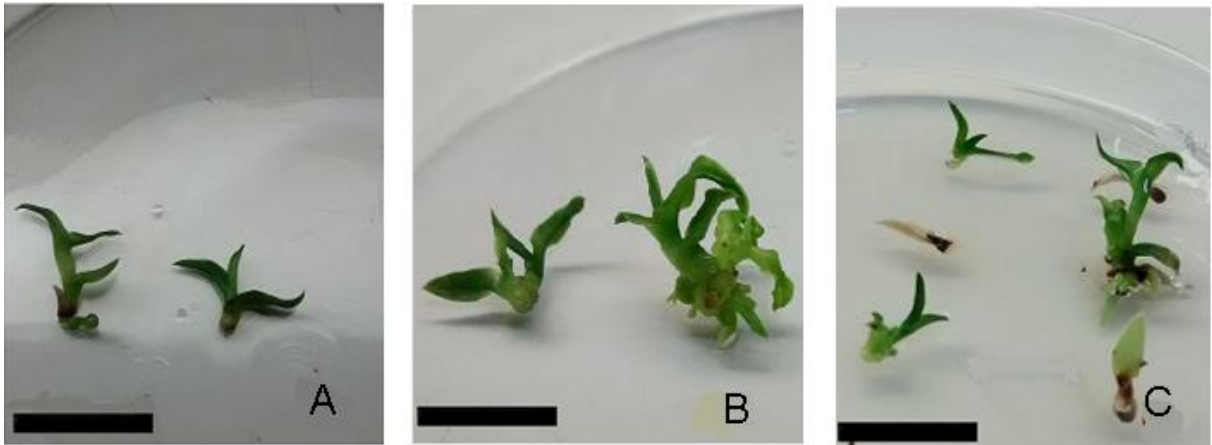


FIGURA 3: Regeneração de brotações de *Hadrolaelia grandis*, após 60 dias de cultivo. A- folhas cultivadas em meio MS, acrescido de 2,2 μM de BAP; B- Folhas cultivadas em meio MS acrescido de 4,4 μM de BAP; C- folhas induzidas à regeneração em meio MS, acrescido de 2,2 μM de BAP e 4,4 μM de ANA. (Barras: 1 cm)